

## WEST Search History

DATE: Wednesday, April 30, 2003

<u>Set Name</u>	<u>Query</u>	<u>Hit Count</u>	<u>Set Name</u>
side by side			result set
<i>DB=USPT,PGPB,JPAB,EPAB,DWPI; THES=ASSIGNEE; PLUR=YES; OP=ADJ</i>			
L6	L5 with cartilage	38	L6
L5	alginate with chondro\$5	389	L5
L4	L3 same (test with (system or agent or compound or effect))	24	L4
L3	chondro\$6 with cartilage	2373	L3
L2	cartilage with test with (system or agent)	26	L2
L1	alginate near2 recover\$3 near3 chondrocytes	1	L1

END OF SEARCH HISTORY

WEST



Generate Collection

L4: Entry 22 of 24

File: JPAB

Apr 3, 2001

PUB-NO: JP02001089390A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 2001089390 A

TITLE: NEW METHOD OF SCREENING THERAPEUTIC AGENT FOR CARTILAGE DISORDER

PUBN-DATE: April 3, 2001

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

KAI, YUJI

KOKITA, KIYOKO

KATSUMATA, TAKASHI

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD

APPL-NO: JP11261498

APPL-DATE: September 16, 1999

INT-CL (IPC): A61 K 45/00; A61 P 19/02; A61 P 19/04; C12 Q 1/02; G01 N 33/15; G01 N 33/50

## ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new method of screening a therapeutic agent for cartilage disorders, etc.

SOLUTION: This method of screening the therapeutic agent for the cartilage disorders comprises adding a test substance to a cultured chondrocyte and measuring the activity for forming a chondron by using the cultured chondrocyte. The therapeutic agent for the cartilage disorders, etc., is obtained by using the method for screening. The cartilage disorders are osteoarthritis, cartilage defects, cartilage damages or meniscus damages. A cultured chondrocyte treated with an inflammatory cytokinin such as interleukin 1, interleukin 6 or tumor necrosis factor(TNF) is used as the cultured cartilage cell.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-89390

(P2001-89390A)

(43) 公開日 平成13年4月3日(2001.4.3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 19/02		A 6 1 P 19/02	4 B 0 6 3
	19/04	19/04	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-261498

(22) 出願日 平成11年9月16日(1999.9.16)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 関 祐司

大阪府河内長野市千代田南町23-23

(72) 発明者 小北 季世子

大阪府豊中市宮山町3-9-10

(72) 発明者 勝又 隆

兵庫県三田市あかしあ台1-37-2

(74) 代理人 100107629

弁理士 中村 敏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨障害治療剤の新規なスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 軟骨障害治療剤の新規なスクリーニング方法等を提供すること。

【解決手段】 培養軟骨細胞を用いてコンドロン形成活性を測定することを特徴とする軟骨障害治療剤のスクリーニング方法、および該スクリーニング方法を用いて得られる軟骨障害治療剤等。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 培養軟骨細胞に被験物質を添加し、コンドロロン形成活性を測定することを特徴とする、コンドロロン形成促進剤のスクリーニング方法。

【請求項2】 培養軟骨細胞に被験物質を添加し、コンドロロン形成活性を測定することを特徴とする、軟骨障害治療剤のスクリーニング方法。

【請求項3】 軟骨障害が、変形性関節症、軟骨の欠損、軟骨損傷又は半月板損傷である、請求項2記載のスクリーニング方法。

【請求項4】 軟骨障害治療剤の他のスクリーニング方法により少なくとも一次評価された候補物質を培養軟骨細胞に添加し、コンドロロン形成活性の有無を測定する方法。

【請求項5】 培養軟骨細胞にアスコルビン酸またはその類縁体を添加することによりコンドロロンの形成される現象を利用した、培養軟骨細胞に対するアスコルビン酸またはその類縁体の作用の解析方法。

【請求項6】 インターロイキン1、インターロイキン6、またはTNFなどの炎症性サイトカインで処理した培養軟骨細胞を用いる、請求項1〜5いずれか記載の方法。

【請求項7】 グルココルチコイドなどのステロイドホルモンで処理した培養軟骨細胞を用いる、請求項1〜5いずれか記載の方法。

【請求項8】 請求項1、2、3、4、6又は7に記載の方法を用いて得られる、アスコルビン酸以外の軟骨障害治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、軟骨障害治療剤の新規なスクリーニング方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、培養軟骨細胞を用いてコンドロロン形成活性を測定することを特徴とする軟骨障害治療剤のスクリーニング方法、および該スクリーニング方法を用いて得られる軟骨障害治療剤などに関する。

## 【0002】

【従来の技術】軟骨は軟骨細胞とこれを取り囲む基質からなる結合組織であり、関節、脊柱の椎間板、肋軟骨、耳介、外耳道、恥骨結合、咽喉蓋などに存在する。軟骨は、軟骨細胞および軟骨細胞が産生する軟骨基質からなり、軟骨基質は軟骨の張力、剪断力および剛性に関与するコラーゲン線維などの線維成分、軟骨組織特有の膨潤性（すなわち圧縮力に対する強度）に関与するプロテオグリカン、および水を主な成分としている。軟骨は軟骨基質の混じりぐあいにより、硝子軟骨（肋軟骨、咽喉軟骨、関節軟骨など）、弾性軟骨（耳介軟骨など）及び線維軟骨（椎間板軟骨、恥骨軟骨など）に分類することができる。このうち硝子軟骨における軟骨細胞とその特異的なミクロ環境は、コンドロロン（またはラクナ）と呼ば

れている（C.A. Poole, H. Shinkai: The Bone, 4: 45-50, 1990）。このコンドロロンは、軟骨細胞、その周囲の間隙（ラクナスペース）、および外周囲の囲みから構成される繭状の構造で、軟骨基質のホメオスタシスを保つうえで、機能と代謝にあずかる単位であると言われている。コンドロロンは、コラーゲン、プロテオグリカンおよび糖蛋白を成分としたヘテロな複合体を、その周囲の基質の成分よりもさらに高密度で構成し、外圧からの軟骨細胞保護、あるいは細胞と基質間の物質透過の働きをしていると言われている（C. A. Poole: J. Anat., 191: 1-13, 1997）。このように軟骨組織の機能維持においてコンドロロンが重要な役割を果たしていることが近年明らかになってきたが、当該コンドロロンを *in vitro* で形成させたという報告はなく、また、このコンドロロンの形成現象に着目してこれを医薬品（軟骨障害治療剤）の開発に利用したといった報告もなされていない。

【0003】ところで軟骨障害に関しては、従来より軟骨の障害に起因する種々の疾患が知られており、例えば、変形性関節症をはじめとして、軟骨形成の障害による骨折の修復・治癒不全などが知られている。特に、高齢化社会の到来、あるいはスポーツによる外傷の増加などにより関節障害患者は著しく増加しており、この領域における医療の進歩が要望されている。従来から軟骨障害を治療するために種々の治療法が試みられてきているが、それらは直接的な原因の解消を目的とするものではなく、例えば抗炎症剤などを投与することにより、その疾患に基づく痛みなどの障害を抑制する方法、あるいは関節にヒアルロン酸製剤などを注入して関節の動きを潤滑にする方法など、対症療法的なものでしかない。また軟骨欠損に対する治療法として、軟骨細胞移植が行なわれているが、移植後のホスト側の軟骨基質との接着が不十分であり、治療法としての確立はなされていない。さらに軟骨細胞移植治療法は侵襲性であることから、患者への負担が大きく、また感染の可能性も否定できない。以上のように軟骨障害の根治的治療法は見出されていないことから、特に患者数が多い変形性関節症などでは、その有効な治療剤、および当該治療剤探索のための新規なスクリーニング系の構築が期待されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、軟骨障害治療剤の新規なスクリーニング方法を提供することを目的とする。すなわち本発明は、培養軟骨細胞を用いてコンドロロン形成活性を測定することを特徴とする軟骨障害治療剤のスクリーニング方法、および該スクリーニング方法を用いて得られる軟骨障害治療剤などを提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは従来より、培養軟骨細胞を用いて種々の機能検討を行ってきた。その過程で本発明者らは、培養軟骨細胞にアスコルビン酸

を添加することにより、軟骨基質のホメオスターシスを保つうえて機能と代謝にあずかる単位であるコンドロンの形成されるとい現象を見出した。このような、in vitroでコンドロンの形成をみたのは本発明がはじめてであり、また当該コンドロンの形成がアスコルビン酸の作用により起こることも、本発明において初めて見出したものである。

【0006】アスコルビン酸に関しては、軟骨障害に対して治療効果を有することが既にin vivoで知られていた。すなわち、モルモットの軟骨変性モデルにアスコルビン酸を投与したところ、軟骨の変性が抑制されたと報告されている (K.C.R.Meacock et al : J.Exp.Path., 71 : 279 - 293, 1990, Edith R.S. et al : Arthritis. Rheum., 24(11) 1345 - 1355, 1981, Edith R.S. et al : Lab. Animal Sci., 31 : 683 - 687)。また変性関節症患者にアスコルビン酸を大量に投与した結果、膝の痛みの緩和、および軟骨変性の進行の抑制が報告されている (Timothy M. et al : Ann. Rheum. Dis., 56 : 397 - 402, 1997)。

【0007】このように、アスコルビン酸はin vivoで軟骨変性抑制作用を有することが知られていた。しかし、当該アスコルビン酸の生理作用は多岐にわたっており、軟骨障害治療剤、変性関節症治療剤としての利用を考えた場合には目的とされる以外の生理作用を有しない治療薬が望まれること、さらにアスコルビン酸は酸化分解しやすく不安定であることなどから、アスコルビン酸自身は治療薬として限界があると考えられていた。このような背景から、アスコルビン酸と同様の軟骨変性抑制作用を有する別の化合物の同定が望まれている状況にあった。しかし、アスコルビン酸の in vivoでの軟骨変性抑制作用は前記の如く公知であったが、その作用機序は未だ特定されていなかったため、軟骨に対するアスコルビン酸様の作用を有する物質をin vitroで効率良くかつ迅速にスクリーニングする手段は未だ見出されていなかった。

【0008】前記のように本発明において初めて、アスコルビン酸の軟骨に対する in vitroの作用としてコンドロ形成活性を有することが明らかとなった。そしてこの知見を得たことにより、アスコルビン酸様作用を有する物質をin vitroで効率良くかつ迅速にスクリーニングする系を構築することに成功した。すなわち本発明のスクリーニング系は、培養軟骨細胞を用いてコンドロ形成活性を測定することと特徴とするものであり、当該スクリーニング系は、アスコルビン酸の化学構造にとらわれることなく、幅広い化学構造の化合物を対象として当該アスコルビン酸様作用(コンドロ形成作用)を保持する軟骨障害治療剤を探索することができるものである。さらに、in vitroでコンドロ形成されるとい事象を見たのは本発明がはじめてであり、従って本発明は、コンドロ形成のメカニズム等を解析する上での重

要な手段を提供するという側面も有するものである。本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0009】すなわち本発明は、(1) 培養軟骨細胞に被験物質を添加し、コンドロ形成活性を測定することを特徴とする、コンドロ形成促進剤のスクリーニング方法、(2) 培養軟骨細胞に被験物質を添加し、コンドロ形成活性を測定することを特徴とする、軟骨障害治療剤のスクリーニング方法、(3) 軟骨障害が、変性関節症、軟骨の欠損、軟骨損傷又は半月板損傷である、前記(2)記載のスクリーニング方法、(4) 軟骨障害治療剤の他のスクリーニング方法により少なくとも一次評価された候補物質を培養軟骨細胞に添加し、コンドロ形成活性の有無を測定する方法、(5) 培養軟骨細胞にアスコルビン酸またはその類縁体を添加することによりコンドロンの形成される現象を利用した、培養軟骨細胞に対するアスコルビン酸またはその類縁体の作用の解析方法、(6) インターロイキン1、インターロイキン6、またはTNFなどの炎症性サイトカインで処理した培養軟骨細胞を用いる、前記(1)～(5)いずれか記載の方法、(7) グルココルチコイドなどのステロイドホルモンで処理した培養軟骨細胞を用いる、前記(1)～(5)いずれか記載の方法、ならびに(8) 前記(1)、(2)、(3)、(4)、(6)又は(7)に記載の方法を用いて得られる、アスコルビン酸以外の軟骨障害治療剤、に関する。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本発明のスクリーニング方法とは、培養軟骨細胞に被験物質を添加し、コンドロ形成活性を測定することを特徴とする、コンドロ形成促進剤、軟骨障害治療剤のスクリーニング方法である。

【0011】本発明のスクリーニング方法において用いられる培養軟骨細胞とは、軟骨より単離・調製された細胞を指し、当該培養軟骨細胞としては、たとえばウサギ肋軟骨・関節軟骨由来の初代培養軟骨細胞が挙げられる。また該細胞以外に、ウサギ以外の動物種の初代培養軟骨細胞、または株化された軟骨細胞も使用することができる。株化軟骨細胞としては、SW1353細胞、HIG-82細胞(米国アメリカン タイプ カルチャー コレクション)などが挙げられる。前記初代培養軟骨細胞は、例えば Calcif.Tissue Res., 19,(1975)に記載の方法等の常法に準じて単離することができる。また前記初代培養軟骨細胞および株化軟骨細胞は、通常の培養条件により培養することができる。なお初代培養軟骨細胞の場合、軟骨細胞としての性質がスクリーニングに使用するために許容される範囲内であれば、一定期間、継代して使用することもできる。

【0012】以上のような培養軟骨細胞を実際にスクリーニングに用いる際には、正常な状態のものを用いることもできるが、インターロイキン1(IL-1)、インター

ロイキン6 (IL-6)、またはTNFなどの炎症性サイトカインで処理した当該軟骨細胞も用いることができる。すなわち、これら炎症性サイトカインで軟骨細胞を処理することにより細胞は障害を受け、より軟骨障害に近い状態になることが知られていることから (P.Thomas et al : Ann. Rheum. Dis., 50: 75 - 80, 1991)、軟骨障害治療剤のスクリーニングにおいては、以上のようなサイトカインで処理した軟骨細胞も用いることができる。なお、当該サイトカインはいずれも市販されており、シグマ社製のものなどを使用することができる。

【0013】さらに前記スクリーニングにおいては、グルココルチコイドなどのステロイドホルモンで処理した培養軟骨細胞も使用することができる。すなわち、変形性関節症ではステロイドホルモンを関節内に投与する治療法が行われているが、当該治療法では軟骨細胞に対し悪影響を及ぼす可能性が報告されていることから (Friedman D.M. et al : J. Rheumatol., 7 (6) : 850 - 856, 1980)、本発明の軟骨障害治療剤のスクリーニングにおいては、グルココルチコイドのようなステロイドホルモンで処理してダメージを与えた軟骨細胞も用いることができる。なお、当該ステロイドホルモンはいずれも市販されており、シグマ社製のものなどを使用することができる。

【0014】本発明においてコンドロンは、コラーゲン、プロテオグリカンおよび糖蛋白を成分としたヘテロな複合体であり、軟骨細胞、その周囲の間隙 (ラクナスペース)、および外周囲の囲みから構成される嚢状の構造を示す。当該嚢状構造はコンドロンに特有の構造であることから、たとえば、培養した軟骨細胞に適切な染色を施した後、顕微鏡下で観察することにより、当該コンドロンを同定・計数することができる。

【0015】本発明におけるコンドロ形成活性の測定は、培養軟骨細胞に被験物質を添加して行うものであり、例えば以下の方法に準じて行うことができる。すなわち、培養軟骨細胞に対して培養液中の濃度が1~30 $\mu$ M程度になるように被験物質を添加し、その後適当な時間インキュベーションをした後、培地を除去して95%エタノールで細胞を固定する。固定後、エタノールを除去して蒸留水で洗浄し、その後適当な染色液で細胞を染色する。染色液としては、トルイジンブルー液、アルシアンブルー液などが挙げられる。その後プレートを風乾し、光学顕微鏡下でコンドロ形成の有無およびコンドロ数をカウントすることにより、被験物質がコンドロ形成活性を有するか否かを測定することができる。その際、コントロールである無処置群ではコンドロ形成されないのに対して、被験物質処置群ではコンドロ形成されていれば、その被験物質はコンドロ形成活性を有すると判断される。さらに、コンドロ数をカウントすることにより、コンドロ形成活性の程度を判断することができる。以上のような測定法の具体例は、後

述の実施例に記載されている。

【0016】さらに、上記のような測定方法の他、コンドロンを選択的に染色可能な方法、たとえばコンドロンの成分に対する抗体を酵素標識あるいは蛍光標識することによる抗体染色法などによっても、コンドロ形成活性を測定することができる。

【0017】本発明のスクリーニング方法により、単独でコンドロ形成活性を有する物質を選択できる他、アスコルビン酸の有するコンドロ形成活性をさらに促進する物質をも選択することができる。すなわち、培養軟骨細胞に対してアスコルビン酸と共に被験物質を添加することにより、アスコルビン酸の有するコンドロ形成活性を促進する物質をスクリーニングすることができる。

【0018】以上のようなスクリーニング方法を用いることにより、コンドロ形成促進剤を容易に選別することができる。選別されたコンドロ形成促進剤の中には、アスコルビン酸の如き軟骨障害治療剤が存在する。

【0019】さらに前記スクリーニング方法は、ケミカルライブラリー等を対象としたいわゆる一次スクリーニングにおいて使用されるのみならず、軟骨障害治療剤の他のスクリーニング方法により少なくとも一次評価された候補化合物 (陽性化合物) がコンドロ形成活性を有するか否かを評価・特徴付けするためにも使用される。また、軟骨の周囲に存在する骨、靱帯、腱などに対する何らかの作用が知られているあるいは予想される候補化合物がコンドロ形成活性を有するか否かを評価・特徴付けするためにも使用される。具体的には、前記の如く少なくとも一次評価された候補化合物、あるいは他の組織での活性が評価ないしは予想された候補化合物を培養軟骨細胞に添加し、前記と同様のコンドロ形成活性を測定することにより実施することができる。なおその際、炎症性サイトカインやステロイドホルモンで処理した培養軟骨細胞も用い得ることは言うまでもない。

【0020】本発明においては、以上のような本発明のスクリーニング方法や二次評価方法を通して選ばれる軟骨障害治療剤をも包含するものであり、当該軟骨障害治療剤としては、例えばアスコルビン酸の類縁体であるイソプロピルジニアスコルビン酸やデヒドロアスコルビン酸 (30,136-1, 26,155-6, アルドリッチ) 等から選択され得る。ここで治療対象となる軟骨障害とは、具体的には、例えば変形性関節症、軟骨の欠損、軟骨損傷、半月板損傷などが挙げられる。また、軟骨細胞移植時の補助療法剤としての用途も軟骨障害治療剤の用途に含まれる。

【0021】本発明の軟骨障害治療剤は、以下のような投与方法、投与形態および投与量が使用され得る。すなわち、本発明の軟骨障害治療剤の患者への投与方法としては、経口投与による投与が好ましいが、坐薬としての投与、静脈内投与、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹

腔内投与なども行い得る。本発明の軟骨障害治療剤は、上記の投与方法に依存して、種々の単位投与形態で投与することができる。例えば経口投与のための医薬組成物は、例えば結合剤（例えばポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、充填剤（例えばラクトース、セルロースまたはリン酸カルシウム）、滑沢剤（例えばステアリン酸マグネシウムまたはタルク）、崩壊剤（例えば澱粉グリコール酸ナトリウム）などの薬学上許容可能な賦形剤を用いて常法により製造した錠剤、粉末剤またはカプセルの形態をとることができる。錠剤は、当該技術分野の周知の方法によってコーティングを施すことができる。

【0022】経口投与用の液体製剤は、例えば溶液、シロップまたは懸濁液の形態をとることができ、またはこれらを使用前に水または他の適当なビヒクルで構成する乾燥生成物として提供することができる。このような液体製剤は、懸濁剤（例えばソルビトールシロップまたはメチルセルロース）、乳化剤（例えばレシチン）、非水性ビヒクル（例えば油状エステルまたはエチルアルコール）、および防腐剤（例えばp-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはプロピル）のような薬学上許容可能な添加剤を用いて常法により製造することができる。口中への局所投与には、常法で処方した舌下錠、ドロップまたはトローチなどの形態をとることができる。

【0023】静脈内投与のためには、本発明の治療剤を水性担体の中に溶解または懸濁させて用いることができる。皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与のためには、本発明の治療剤を水性または油担体の中に溶解または懸濁させて用いることができる。あるいは、コラーゲン等の生体親和性の材料を用いて、徐放性製剤として投与することもできる。以上のような軟骨障害治療剤の投与量は、例えば経口投与の場合、一日量 0.0001mg ~ 1g、好ましくは 0.001mg~10mg程度を症状が改善されるまで投与することが可能である。

【0024】本発明においてはさらに、培養軟骨細胞にアスコルビン酸またはその類縁体を添加することによりコンドロンの形成される現象を利用した、当該軟骨細胞に対するアスコルビン酸またはその類縁体の作用の解析方法をも提供するものである。従来技術において記載したように、本発明は、培養軟骨細胞にアスコルビン酸を添加することにより、in vitroではじめて、コンドロ形成現象を見たものである。ひとたびアスコルビン酸の作用により軟骨細胞がコンドロンを形成することが明らかになれば、この系を利用することにより、アスコルビン酸の軟骨細胞に対する作用メカニズムを詳細に解析することができる。具体的には、例えばこの系にコラーゲン合成阻害剤、アスコルビン酸トランスポート阻害剤を添加し、コンドロ形成活性を測定するといった解析方法が挙げられる。なお、ここで用いられるアスコルビン酸は市販されており、例えば和光純薬社製、関東化学

社製のものなどを用いることができる。また本解析方法においても、前記の如く炎症性サイトカインやステロイドホルモン等で処理した培養軟骨細胞が使用され得る。

【0025】さらにアスコルビン酸のみならず、当該アスコルビン酸の類縁体にもコンドロ形成活性を有するものが存在し得、このような類縁体も本解析方法において使用され得る。具体的には、例えばイソプロピリジンアスコルビン酸やデヒドロアスコルビン酸（30,136-1、26,155-6、アルドリッチ）等から選択され得る。

【0026】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。

【0027】実施例1

アスコルビン酸によるコンドロ形成活性の測定

1) 細胞と細胞培養

Calcif. Tissue Res. 19 (1975) に記載の方法をもとに、3週齢 日本白色ウサギの肋軟骨から成長板軟骨細胞を単離した。単離された軟骨細胞は、10% FBS、500 U/ml ペニシリン、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含むDMEM/F-12等比混合培地（以下、培地Aと称す）中で37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> / 95 % 空気下で維持した。

【0028】2) コンドロ形成活性の測定

前記1) で単離した軟骨細胞を、6 mm ウエル（コラーゲンコート96穴プレート）当たり  $2 \times 10^4$  個の密度で播種し、0.15 mLの培地Aで維持した。24時間後、アスコルビン酸（L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩水和物、和光純薬社製）を含有する0.15 mLの培地（0.3 % FBS、500 U/ml ペニシリン、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含むDMEM/F-12等比混合培地、以下培地Bと称す）で48時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、培地Bを除去し、95%エタノールで5分間固定した。固定後、95%エタノールを除去し、蒸留水で洗浄してから、0.05 % トルイジンブルー液（メルク社製）で3分間染色した。染色後、蒸留水で洗浄し、プレートを風乾させた。光学顕微鏡を用い、コンドロ形成の有無および1穴当たり形成されたコンドロ数をカウントした。その結果、アスコルビン酸は表1に示すようにコンドロ形成を誘発・促進することが明らかとなった。

【0029】なお、軟骨細胞のプロテオグリカン合成促進作用が報告されているTGF- $\beta$ 、IGF-1、PTH、および軟骨細胞増殖促進作用が報告されているb-FGF（糖質II（新生物化学実験講座3）：226～，1991）についても同様の検討を行ったが、コンドロンの形成は観察されなかった。従ってコンドロンの形成は、プロテオグリカン合成促進作用あるいは細胞増殖促進作用とは異なった機序の作用によることが示された。

【0030】

【表1】

アスコルビン酸 ( $\mu\text{g/ml}$ )	コンドロロン数	
0	0	0
0.4	0	0
2	201	221
10	553	570
50	1152	986

## 【0031】実施例2

## コンドロロン形成促進剤のスクリーニング

実施例1で用いたアスコルビン酸の代わりに被験化合物（培養液中濃度1～30 $\mu\text{M}$ ）を用い、実施例1と同様の手法によりコンドロロン形成の有無および形成されたコンドロロン数をカウントすることにより、被験化合物がコンドロロン形成活性を有するか否かを測定することができる。その際、コントロールである無処置群ではコンドロ

ロンが形成されないのに対して、被験物質処置群ではコンドロロンが形成されていれば、その被験物質はコンドロロン形成活性を有すると判断される。さらに、コンドロロン数をカウントすることにより、コンドロロン形成活性の程度を判断することができる。

## 【0032】

【発明の効果】本発明により、培養軟骨細胞を用いてコンドロロン形成活性を測定することの特徴とする軟骨障害治療剤のスクリーニング方法、および該スクリーニング方法を用いて得られる軟骨障害治療剤などが提供される。本発明のスクリーニング方法は、アスコルビン酸のコンドロロン形成促進作用と同様の作用を有する、又は当該アスコルビン酸の作用をさらに促進する作用を有する物質を選択的かつ迅速にスクリーニングすることができるという利点を有する。

10

---

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/50

Z

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BA14 BB20 BB22  
BB24 CB13 DA80 FA16 GC22  
4B063 QA01 QA05 QQ08 QQ61 QQ79  
QQ91 QQ93 QR48 QR51 QR69  
QR77 QS11 QS24 QS36 QX01  
4C084 AA17 NA20 ZA962 ZC802